

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 7 月 10 日 (10.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/056009 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09 (SAWASAKI, Tatsuya) [JP/JP]; 〒790-0811 愛媛県 松山市 本町 3-1-8-7 0 1 Ehime (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/13756
- (22) 国際出願日: 2002 年 12 月 27 日 (27.12.2002) (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒541-0044 大阪府 大阪市 中央区 伏見町 四丁目 2 番 1 4 号 藤村 大和生命ビル Osaka (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願 2001-396941 2001 年 12 月 27 日 (27.12.2001) JP
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 遠藤 弥重太 (ENDO, Yaeta) [JP/JP]; 〒791-8016 愛媛県 松山市 久万ノ台 4 7 8-1 7 Ehime (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 澤崎 達也
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

/続葉有/

(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES HAVING ACTIVITY OF CONTROLLING TRANSLATION EFFICIENCY AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: 翻訳効率制御活性を有するヌクレオチド配列及びその利用

(57) Abstract: A method of preparing a polynucleotide containing a nucleotide sequence which has an activity of controlling the translation efficiency of a template in a protein synthesis system, characterized by comprising (a) applying a template containing one or more arbitrary nucleotide sequences to a protein synthesis reaction system, (b) after reacting, recovering a polyribosome fraction from the liquid reaction mixture, and (c) collecting a polynucleotide containing the nucleotide sequence in the template from the polyribosome fraction; novel polynucleotides having an activity of controlling translation efficiency which are obtained by the above method; a method of synthesizing a protein with the use of a template containing such a polynucleotide; and so on.

(57) 要約:

本発明は、タンパク質合成系において鋳型の翻訳効率を制御する活性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの調製方法であって、(a) 1 種以上の任意のヌクレオチド配列を含む鋳型をタンパク質合成反応系に供し、(b) 反応後、該反応液中からポリリボソーム画分を回収し、(c) 該ポリリボソーム画分に含まれる鋳型中の該ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを採取することを特徴とする方法、該方法により得られる翻訳効率を制御する活性を有する新規ポリヌクレオチド、および該ポリヌクレオチドを含む鋳型を用いたタンパク質合成方法等を提供する。

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/056009 A1



GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特  
許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

## 明 細 書

### 翻訳効率制御活性を有するヌクレオチド配列及びその利用

#### 技術分野

本発明は、タンパク質合成系において鋳型の翻訳効率を制御する活性を有するヌクレオチド配列の選抜方法、及び該ヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの調製方法、並びに該ポリヌクレオチドの利用等に関する。

#### 背景技術

細胞内で行われているタンパク質の合成反応は、まず遺伝情報をもつ DNA からその情報が mRNA に転写され、リボソーム上でその mRNA の情報が翻訳されてタンパク質が合成されるという工程で進行している。この細胞内におけるタンパク質合成を生体外で行う方法として、例えば細胞内に備わるタンパク質翻訳装置であるリボソーム等を含む成分を生物体から抽出し、この抽出液に転写または翻訳のための鋳型（以下、包括的に「鋳型」という）、基質となる核酸およびアミノ酸、エネルギー源、各種イオン、緩衝液、及びその他の有効因子を加えて試験管内で行う方法（以下、これら一連の操作を「無細胞タンパク質合成系」と称することがある）の開発が盛んに行われている（特開平 6－9 8 7 9 0 号公報、特開平 6－2 2 5 7 8 3 号公報、特開平 7－1 9 4 号公報、特開平 9－2 9 1 号公報、特開平 7－1 4 7 9 9 2 号公報等）。

無細胞タンパク質合成系は、ペプチド合成速度と翻訳反応の正確性においては生細胞に匹敵する性能を保有しており、かつ複雑な化学反応工程や煩雑な細胞培養工程を必要としない利点を有する。また、最近ではより翻訳効率を高くするために、従来の無細胞タンパク質合成系に用いる細胞、あるいは組織の抽出液中に混入している一群の核酸分解酵素、翻訳阻害タンパク質因子、タンパク質分解酵素等を不活化したり（特開 2 0 0 0－2 3 6 8 9 6 号公報）、混入を防ぐ（特開 2

000-236896号公報)等の開発も行われている。

一方、翻訳効率そのものを向上させるヌクレオチド配列のタンパク質合成効率向上への利用も知られている。そのような翻訳促進配列として、真核生物においては、5' キャップ構造 (Shatkin, Cell, 9, 645- (1976))、コザック配列 (Kozak, Nucleic Acid. Res., 12, 857- (1984) )等があり、また原核生物においてはシャインダルガーノ配列等が知られている。更にはRNA ウィルスの5' -非翻訳リーダー配列にも翻訳促進活性があることが見出されており (特許第2814433号公報)、これらの配列を用いてタンパク質合成を効率よく行う方法が開発されている (特開平10-146197号公報)。

しかし、これらの翻訳促進配列は、転写を行うRNAポリメラーゼとの特異性がある等タンパク質合成に利用するのに必ずしも適したものとは言い難かった。また、人工的にランダム化された非天然のヌクレオチド配列が翻訳効率制御活性を有する例は知られていなかった。

したがって、本発明の目的は、無細胞タンパク質合成系において鑄型の翻訳効率を制御する活性を有する新規のヌクレオチド配列、および該ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの取得方法を提供することであり、該ポリヌクレオチドを含む核酸分子を鑄型として用いた、より効率的なタンパク質合成方法等を提供することである。

#### 発明の開示

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、22および57merのランダムな配列を有するポリヌクレオチドを5' 非翻訳領域に含む、ルシフェラーゼタンパク質を合成するための鑄型を用いて、コムギ胚芽抽出液による無細胞タンパク質合成を行った後、該反応液からショ糖密度勾配遠心法によりポリリボソーム画分を回収し、該画分中の鑄型RNAに含まれる上記ランダム配列のヌクレオチド配列解析を行い、該ヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチ

ドを含む鋳型を用いてタンパク質合成を行ったところ、翻訳効率が上昇することを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて成し遂げられたものである。

即ち、本発明によれば、

1. タンパク質合成系において鋳型の翻訳効率を制御する活性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの調製方法であって、(a) 1 種以上の任意のヌクレオチド配列を含む鋳型をタンパク質合成反応系に供し、(b) 反応後、該反応液中からポリリボソーム画分を回収し、(c) 該ポリリボソーム画分に含まれる鋳型中の該ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを採取することを特徴とする方法、
2. 工程(c)で得られたヌクレオチド配列を含む鋳型を用いて、前記 (a) ~ (c) の工程を繰り返すことを特徴とする上記 1 記載の方法、
3. 工程(c)で得られたヌクレオチド配列に変異を導入した配列を含む鋳型を用いて、前記 (a) ~ (c) の工程を繰り返すことを特徴とする上記 1 記載の方法、
4. ポリリボソーム画分の回収方法が、密度勾配遠心法を利用することを特徴とする上記 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法、
5. タンパク質合成系が、コムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系である上記 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法、
6. 1 種以上の任意のヌクレオチド配列が、スタートコドンを持たないランダム配列であることを特徴とする上記 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法、
7. ランダム配列の長さが、3 ~ 200mer の範囲内であることを特徴とする上記 6 記載の方法、
8. 翻訳増強活性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの調製方法であることを特徴とする上記 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法、
9. 翻訳増強活性が RNA ウィルスの 5' - 非翻訳リーダー配列が有する活性と同等か、またはそれ以上であることを特徴とする上記 8 記載の方法、
10. 上記 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法により得られる翻訳効率を制御する活

性を有するポリヌクレオチド、

11. 配列番号11～135のいずれかで表されるヌクレオチド配列を含む翻訳増強活性を有するポリヌクレオチド、

12. 3～200merの長さの人工的なランダムヌクレオチド配列からなる翻訳効率を制御する活性を有するポリヌクレオチド、

13. 翻訳効率を制御する活性が、RNA ウィルスの5' -非翻訳リーダー配列が有する活性と同等か、またはそれ以上であることを特徴とする上記12記載のポリヌクレオチド、

14. 上記9～13のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む鋳型、

15. 上記14記載の鋳型を用いることを特徴とするタンパク質合成方法、

16. 上記9～13のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むベクター、

17. タンパク質合成系において鋳型の翻訳効率を制御する活性を有するヌクレオチド配列の選抜方法であって、(a) 1種以上の任意のヌクレオチド配列を含む鋳型をタンパク質合成反応系に供し、(b) 反応後、該反応液中からポリリボソーム画分を回収し、(c) 該ポリリボソーム画分に含まれる鋳型中の該ヌクレオチド配列を解析することを特徴とする方法、および

18. 工程(c)で得られたヌクレオチド配列を含む鋳型を用いて、前記(a)～(c)の工程を繰り返すことを特徴とする上記17記載の方法が提供される。

#### 図面の簡単な説明

図1は、H、VまたはB塩基組成の22merランダム配列を含む翻訳鋳型の鋳型活性を示す。縦軸は $^{14}\text{C}$ -Leuの取込み(dpm/5 $\mu\text{l}$ )、横軸はインキュベーション時間(時間)を示す。

図2は、10～60%ショ糖密度勾配遠心により分画されたタンパク質合成反応液の各画分の260nmにおける吸光度を示す。鋭いピークが80Sリボソーム含有画分であり、それよりも高濃度のなだらかなピークを含む画分がポリリボ

ソーム含有画分を示す。

図3は、H塩基組成の2 2mer (A) および5 7mer (B) のランダム配列を含む翻訳鑄型の各サイクル後の鑄型活性を示す。縦軸は  $^{14}\text{C}$ -Leu の取込み (dpm/5  $\mu\text{l}$ )、横軸はインキュベーション時間 (時間) を示す。

図4は、4サイクル後に選抜された種々のH塩基組成2 2mer 配列 (A) および3サイクル後に選抜された種々のH塩基組成5 7mer 配列 (B) を含む翻訳鑄型の鑄型活性を示す。縦軸は  $^{14}\text{C}$ -Leu の取込み (dpm/5  $\mu\text{l}$ )、横軸はインキュベーション時間 (時間) を示す。

図5は、透析系でタンパク質合成反応を行った場合の、H塩基組成の5 7mer 配列 (No. 57-6) を含む翻訳鑄型の鑄型活性を示す。一定時間 (2 4および4 8時間) 反応後にタンパク質合成反応液を採取し、SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した後、CBBで染色した。矢印が目的のタンパク質 (GFP) のバンドを示す。Mは分子量マーカー、 $\Omega$ は $\Omega$ 配列を含む翻訳鑄型を用いたタンパク質合成反応液を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明は、上記のとおり (a) 1種以上の任意のヌクレオチド配列を含む鑄型をタンパク質合成反応系に供し、(b) 反応後、該反応液中からポリリボソーム画分を回収し、(c) 該ポリリボソーム画分に含まれる鑄型中の該ヌクレオチド配列を解析することを特徴とする、タンパク質合成系において鑄型の翻訳効率を制御する活性を有するヌクレオチド配列の選抜方法；上記工程(c)において、該ポリリボソーム画分に含まれる鑄型中の該ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを採取することを特徴とする、翻訳効率を制御する活性を有するポリヌクレオチドの調製方法；および該ポリヌクレオチドの利用に関するものである。以下、本発明について更に詳細に説明する。

##### (1) 任意のヌクレオチド配列を含む鑄型の作製

本発明の方法に用いられるヌクレオチド配列は、翻訳効率を制御する活性があり得る配列であればいずれのものでも良く、例えば、既知遺伝子の5' 非翻訳領域に含まれる配列なども挙げられるが、好ましくは3～200mer、より好ましくは10～200merの長さの、人工的に合成されたランダム配列であってスタートコドンを含まない配列が用いられる。

該配列を有するポリヌクレオチド群（以下、これを「候補ポリヌクレオチド」と称することがある）の作製方法としては、例えばランダム配列の場合には、通常のオリゴヌクレオチド合成法において、用いるカラムを、4種類の異なる塩基を有する核酸のミクスチャーを含むものにして化学合成する方法等が挙げられる。ここで、スタートコドンを含まないランダム配列にするためには、上記4種類の塩基のうち、A、T、Gのいずれか1種類以上を含まない核酸の混合物か、いずれか1種類をイノシン等に換えた核酸の混合物によって合成する方法が好ましく用いられる。また、ランダム配列を用いる場合には、該ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を解析したり、ポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) により増幅するためにその5' 端に共通配列を付加することが好ましい。共通配列としては、スタートコドンを含まず、且つPCRのプライマーがアニールし得る配列を有するものならば特に制限はない。その鎖長としては、3～50merの長さのものが好ましい。

候補ポリヌクレオチドは、これを適当なプロモーター配列と、スタートコドンを含みポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド（本明細書中ではこれを「コーディングポリヌクレオチド」と称することがある）との間に挟まれるように結合させて鋳型（転写鋳型）を作製する。コーディングポリヌクレオチドがコードするポリペプチドは、タンパク質合成系において合成され得るものであれば如何なるものであってもよいが、該ポリペプチドの合成量が候補ポリヌクレオチドによる翻訳効率の強弱の指標となるため、それ自体もしくはそれが関与する反応により蛍光や化学発光等の観察しやすい信号を発するもの



が好ましく、更には該信号量とそのタンパク質量が相関するものが好ましい。このようなポリペプチドとしてはルシフェラーゼ等が挙げられる。

コーディングポリヌクレオチドは、上記ポリペプチドのコーディング領域だけでなく、その転写ターミネーション領域等を含む3'非翻訳領域を含むことが好ましい。3'非翻訳領域としては、ストップコドンより下流の約1.0～約3.0キロベース程度が好ましく用いられる。これらの3'非翻訳領域は必ずしも該ポリペプチドをコードする遺伝子本来のそれである必要はない。また、プロモーターとしてはその後転写に用いるRNAポリメラーゼに特異的なものを用いることができる。具体的には、SP6プロモーター、T7プロモーター等が挙げられる。

プロモーター、及びコーディングポリヌクレオチドと候補ポリヌクレオチドの結合方法としては、それ自体既知の常法を用いることができる。具体的には、例えば、プロモーターと候補ポリヌクレオチドの結合には、候補ポリヌクレオチドを化学合成する際に5'側プロモーター配列を連続して合成する方法が用いられる。また、コーディングポリヌクレオチドとの結合方法としては、コーディングポリヌクレオチドを鋳型とし、プロモーター配列を結合して合成された候補ポリヌクレオチドをセンスプライマー、また3'非翻訳領域の3'末端配列からなるポリヌクレオチドをアンチセンスプライマーとしてPCRを行うことにより、それぞれを結合させる方法等が用いられる。

更に、転写、翻訳効率を制御する活性のある既知ヌクレオチド配列を挿入することもできる。このような配列、及び挿入位置としては、真核生物においては、5'キャップ構造 (Shatkin, Cell, 9, 645- (1976)) を翻訳鋳型の5'末端に、また、コザック配列 (Kozak, Nucleic Acid. Res., 12, 857- (1984)) を、本発明の候補ポリヌクレオチドとコーディングポリヌクレオチドとの間に挿入すること等が、また原核生物においてはシャインダルガーノ配列を本発明の候補ポリヌクレオチドとコーディングポリヌクレオチドとの間に挿入すること等が挙げられる。

## (2) 鋳型を用いたタンパク質合成反応

本発明の候補ポリヌクレオチドを含む上記鋳型（転写鋳型）は、必要であればこれを別途転写反応に付して翻訳鋳型（RNA）に変換した後、タンパク質合成反応に供してもよいし、タンパク質合成系が転写反応を同時に行わせ得る場合は、そのまま反応系に供することもできる。用いられるタンパク質合成系としては、翻訳鋳型を翻訳してタンパク質を生成し得る能力のあるものであれば如何なるものであってもよいが、具体的には、生細胞や無細胞タンパク質合成系が挙げられる。無細胞タンパク質合成系としては、大腸菌、植物種子の胚芽、ウサギ網状赤血球等の細胞抽出液等の既知のものが用いられる。これらは市販のものをを用いることもできるし、それ自体既知の方法、具体的には、大腸菌抽出液は、Pratt, J. M. et al., *Transcription and Translation*, Hames, 179-209, B. D. & Higgins, S. J., eds), IRL Press, Oxford (1984)に記載の方法等に準じて調製することもできる。

市販の無細胞タンパク質合成系、または細胞抽出液としては、大腸菌由来のものは、E. coli S30 extract system (Promega 社製) と RTS 500 Rapid Translation System (Roche 社製) 等が挙げられ、ウサギ網状赤血球由来のものは Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega 社製) 等、更にコムギ胚芽由来のものは PROTEIOS™ (TOYOBO 社製) 等が挙げられる。このうち、植物種子の胚芽抽出液の系を用いることが好ましく、植物種子としては、コムギ、オオムギ、イネ、コーン等のイネ科の植物、及びホウレンソウ等のものが好ましい。本発明の無細胞合成系においては、ポリリボソーム形成活性の高いタンパク質合成系が好ましいため、コムギ胚芽抽出液を用いたものが好適である。

コムギ胚芽抽出液の作製法としては、例えば Johnston, F. B. et al., *Nature*, 179, 160-161 (1957)、あるいは Erickson, A. H. et al., (1996) *Meth. In Enzymol.*, 96, 38-50 等に記載の方法を用いることができる。更に、該抽出液中に含まれる翻訳阻害因子、例えばトリチン、チオニン、核酸分解酵素等を含む胚乳を取り除く等の処理（特開 2000-236896 公報等）や、翻訳阻害因子の活性化を

抑制する処理（特開平7-203984号公報）を行うことも好ましい。このようにして得られた細胞抽出液は、従来と同様の方法によりタンパク質合成系に用いることができる。

本発明のタンパク質合成系に用いられる合成反応液の組成として、上記細胞抽出液、候補ポリヌクレオチドを含む翻訳鋳型、基質となるアミノ酸、エネルギー源、各種イオン、緩衝液、ATP 再生系、核酸分解酵素阻害剤、tRNA、還元剤、ポリエチレングリコール、3', 5'-cAMP、葉酸塩、抗菌剤等が含まれる。また鋳型として DNA を用いて転写・翻訳反応を一括して行う場合には、該反応液は、更に RNA 合成の基質、及び RNA ポリメラーゼ等を含むことができる。これらは目的タンパク質や、用いるタンパク質合成系の種類によって適宜選択して調製される。基質となるアミノ酸は、タンパク質を構成する20種類のアミノ酸である。またエネルギー源としては、ATP、または GTP が挙げられる。各種イオンは、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、酢酸アンモニウム等の酢酸塩、グルタミン酸塩等が挙げられる。緩衝液としては、Hepes-KOH、Tris-酢酸等が用いられる。また ATP 再生系としては、ホスホエノールピルベートとピルビン酸キナーゼの組み合わせ、またはクレアチンリン酸（クレアチンホスフェート）とクレアチンキナーゼの組み合わせが挙げられる。核酸分解酵素阻害剤としては、リボヌクレアーゼインヒビターや、ヌクレアーゼインヒビター等が挙げられる。このうち、リボヌクレアーゼインヒビターの具体例としては、ヒト胎盤由来の RNase inhibitor (TOYOBO 社製等) 等が用いられる。tRNA は、Moniter, R., et al., Biochim. Biophys. Acta., 43, 1 (1960) 等に記載の方法により取得することができるし、市販のものを用いることもできる。還元剤としては、ジチオスレイトール等が挙げられる。抗菌剤としては、アジ化ナトリウム、アンピシリン等が挙げられる。更に、RNA ポリメラーゼとしては鋳型に含まれるプロモーターに適したものが用いられる、具体的には、例えば、SP6 RNA ポリメラーゼや T7 RNA ポリメラーゼ等を用いることができる。これらの添加量は適宜選択されて合成反応液が調製される。

このようにして得られたタンパク質合成液は、それぞれ選択されたそれ自体既知のシステム、または装置に投入され、タンパク質合成が行われる。タンパク質合成のためのシステムまたは装置としては、バッチ法 (Pratt, J. M. et al., Transcription and Translation, Hames, 179-209, B. D. & Higgins, S. J., eds), IRL Press, Oxford(1984)) や、アミノ酸、エネルギー源等を連続的に反応系に供給する連続式無細胞タンパク質合成システム (Spirin, A. S. et al., Science, 242, 1162-1164(1988))、透析法 (木川等、第21回日本分子生物学会、WID6)、あるいは重層法 (特願2000-259186明細書) 等が挙げられる。更には、合成反応系に、鋳型の RNA、アミノ酸、エネルギー源等を必要時に供給し、合成物や分解物を必要時に排出する方法 (特開2000-333673公報: 以下これを「不連続ゲル濾過法」と称することがある) や、合成反応槽が分子篩可能な担体によって調製され、上記の合成材料等が該担体を移動相として展開され、展開中に合成反応が実行され、結果として合成タンパク質を回収し得る方法 (特開2000-316595公報) 等を用いることができる。本発明の翻訳効率を制御する活性を有するヌクレオチド配列の選抜方法において用いるタンパク質合成反応は、ポリリボソームを形成することを目的とするため、バッチ法でも充分であると考えられる。

バッチ法によりタンパク質合成を行う場合には、例えば鋳型を除いた上記合成反応液に鋳型を添加してインキュベートすること等により行うことができる。コムギ胚芽抽出液を用いた場合、インキュベートは10~40℃、好ましくは18~30℃、更に好ましくは20~26℃で行う。反応時間は、ポリリボソーム形成能が高い鋳型によるポリリボソーム形成のみが起こるに十分な時間だけ行えば、翻訳増強活性を有するヌクレオチド配列を選抜することができる。具体的には、翻訳増強活性を有するヌクレオチド配列を選抜するに好ましい反応時間としては、5分~2時間の範囲が挙げられ、このうち30分程度が最も好ましい反応時間として挙げられる。反応時間はタンパク質合成阻害酵素の添加により反応を停止さ

せることにより制御することができるが、反応を停止させなくても本発明の方法を行うことはできる。タンパク質合成阻害酵素としては、翻訳反応開始の阻害剤以外であればいずれの阻害剤でもよい。具体的には、例えばシクロヘキシミド、リボトキシン等が挙げられる。リボトキシンとして、具体的には、 $\alpha$ -サルシン (Endo, Y., et al., J. Biol. Chem., 258, 2662-2667(1983))、リボソーム不活化タンパク質 (Endo, Y., et al., J. Biol. Chem., 262, 8128-8130(1987)) 等が挙げられる。これら阻害剤の添加量等は用いるタンパク質合成系において適宜選択されるが、コムギ胚芽抽出液を用いたタンパク質合成系において、シクロヘキシミドを添加する場合には、最終濃度で0.5~10  $\mu$ M程度が好ましい。

透析法によりタンパク質合成を行う場合には、鑄型を添加した合成反応液を透析内液とし、透析外液と物質移動が可能な透析膜によって隔離される装置を用いて、タンパク質合成を行う。具体的には、例えば、鑄型を反応液に添加し、適当時間プレインキュベートした後、適当な透析容器に入れ反応内液とする。透析容器としては、底部に透析膜が付加されている容器 (第一化学社製：透析カップ 12, 000等) や、透析用チューブ (三光純薬社製：12, 000等) が挙げられる。透析膜は、10,000ダルトン以上の分子量限界を有するものが用いられるが、12,000ダルトン程度の分子量限界を有するものが好ましい。透析外液としては、上記合成反応液から鑄型を除いたものが用いられる。反応温度、及び時間は用いるタンパク質合成系において適宜選択される。

重層法を用いてタンパク質合成を行う場合には、鑄型を添加した合成反応液を適当な容器に入れ、該溶液上に、上記透析法に記載した透析外液を界面を乱さないように重層することによりタンパク質合成を行う。具体的には、例えば、上記合成反応液に鑄型を添加して、適当な容器に入れ反応相とする。容器としては、例えばマイクロタイタープレート等が挙げられる。この反応相の上層に上記透析法に記載した透析外液 (供給相) を界面を乱さないように重層して反応を行う。反応温度、及び時間は用いるタンパク質合成系において適宜選択される。また、

両相の界面は必ずしも重層によって水平面状に形成させる必要はなく、両相を含む混合液を遠心分離することによって、水平面を形成することも可能である。両相の円形界面の直径が7mmの場合、反応相と供給相の容量比は1:4~1:8が適当であるが、1:5が好適である。両相からなる界面面積は大きいほど拡散による物質交換率が高く、タンパク質合成効率が上昇する。従って、両相の容量比は、両相の界面面積によって変化する。合成反応は静置条件下で、反応温度、及び時間は用いるタンパク質合成系において適宜選択される。また、大腸菌抽出液を用いると30~37℃で行うことができる。

不連続ゲル濾過法を用いてタンパク質合成を行う場合には、鋳型を添加した合成反応液により合成反応を行い、合成反応が停止した時点で、鋳型のRNA、アミノ酸、エネルギー源等を供給し、合成物や分解物を排出することによりタンパク質合成を行う。具体的には、例えば、上記合成反応液に鋳型を添加して、適当な容器に入れ反応を行う。容器としては、例えばマイクロプレート等が挙げられる。この反応下では、例えば容量の48%容のコムギ胚芽抽出液を含む反応液の場合には反応1時間で合成反応は完全に停止する。このことは、アミノ酸のタンパク質への取りこみ測定やショ糖密度勾配遠心法によるポリリボソーム解析 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 559-564(2000)) により確認することができる。合成反応の停止した上記反応溶液を、予め上記透析法に記載の透析外液と同様の組成の供給液により平衡化したゲル濾過カラムを通す。この濾過溶液を再度適当な反応温度に保温することにより、合成反応が再開し、タンパク質合成は数時間に渡って進行する。以下、この反応とゲル濾過操作を繰り返す。反応温度、及び時間は用いるタンパク質合成系において適宜選択される。

### (3) ポリリボソーム画分の取得

本発明の候補ポリヌクレオチドを含む鋳型を用いたタンパク質合成反応液は、反応後分画され、ポリリボソーム画分が分取される。分画の方法としては、遠心分離法、クロマトグラフィー法、フィルター濾過法等が挙げられるが、遠心分離

法が好ましく用いられる。遠心分離法としては、密度勾配遠心法、平衡密度勾配遠心法、及び通常の分画遠心法等が挙げられるが、密度勾配遠心法が最も好ましく用いられる。

密度勾配遠心法は、予め作製した密度勾配の上に試料溶液を重層して遠心する方法であって、それ自体既知の通常用いられている方法で行うことができる。密度勾配を作製する機器としては、安定な密度勾配を作製することができるものであれば市販のものでも、公知の方法に従って任意の装置を組み合わせたものでもよい。また、濃度の異なる溶液を重層することによっても作製することができる。密度勾配を形成する溶媒としては、シヨ糖、グリセロール、重水 ( $D_2O$ )、無機塩類溶液等が用いられるが、このうちシヨ糖溶液が好ましく用いられる。

ポリリボソームの分取法を、シヨ糖密度勾配遠心法によるものを例に詳細に説明する。シヨ糖密度勾配遠心法によるタンパク質合成反応液の分離は Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 559-564 (2000) に記載の方法等を用いることができる。具体的には、シヨ糖の濃度勾配は、上記タンパク質合成反応液からポリリボソームを分離できる濃度の範囲であれば特に制限はなく、一般的にはその下限が 5 ~ 30 % の範囲で、その上限が 30 % から飽和溶解度までの範囲における濃度勾配が用いられる。このうち下限が 10 % で上限が 60 % の間の濃度勾配が最も好ましく用いられる。またシヨ糖を溶解する緩衝液としては、ポリリボソームと翻訳鋳型の複合体を安定的に保つことができるものであれば如何なるものであってもよいが、具体的には、例えば、Tris-HCl、塩化カリウム、塩化マグネシウム、及びシクロヘキシミド等を含むものが挙げられる。

適当な遠心管等に上記のようなシヨ糖溶液による密度勾配を作製し、この上に反応終了後のタンパク質合成液を、必要に応じて適当な緩衝液にて希釈し、重層する。適当な緩衝液とは、シヨ糖の溶解に用いたものと同様のもの等が好ましく用いられる。また希釈の程度は、共沈しない程度であれば特に制限はないが、好ましくは 1 ~ 100 倍程度に希釈される。希釈したタンパク質合成反応液は、シ

ヨ糖溶液に対して1/100~100倍程度の量を重層することができ、好ましくは50倍程度を重層する。これをポリリボソームを分離できる程度に遠心する。遠心の条件として具体的には、例えば、4℃で80000~400000×gで30分~3時間程度が挙げられる。遠心終了後、適当量ずつ分画し、各分画の核酸量を測定する等してポリリボソームが含まれる画分を同定する。具体的には、例えば、シヨ糖溶液5ml、タンパク質合成反応液100μlによる密度勾配遠心を行った場合、100~200μlずつを1画分とし、各画分についてOD<sub>260</sub>を測定する。この測定値において、例えば、真核生物由来のタンパク質合成系を用いた場合には80Sリボソームを示すピークが存在するが、それより大きな分子量側に存在する、測定値がピークを示す画分を中心とする画分等をポリリボソーム画分として取得する。このようなポリリボソーム画分としては、例えば、後述する実施例2のシヨ糖濃度25~45%画分等が挙げられる。

#### (4) 翻訳効率を制御する活性を有するヌクレオチド配列の選抜及び該塩基配列からなるポリヌクレオチドの取得

かくして取得されるポリリボソーム画分から、ポリリボソームに結合しているRNA(翻訳鋳型)を取得し、該RNAを逆転写してcDNAを取得し、更に該cDNAに含まれる候補ポリヌクレオチド部分の塩基配列を解析することによれば翻訳効率を制御する活性を有するヌクレオチド配列を選抜することができる。また、上記cDNAは、翻訳効率を制御する活性を有するヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むものであり、PCR等により該配列部分を増幅すること等によれば翻訳効率を制御する活性を有するヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを取得することができる。

ポリリボソーム画分から、ポリリボソームに結合しているRNAを取得する方法としては、それ自体既知の方法を用いることができるが、具体的には、Acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法 (Chomczynski, P., et al., Anal. Biochem., 162, 156-159 (1987)) が好ましく用いられる。ここで取得され



る RNA を含む溶液中には、鋳型としてタンパク質合成系に入れられた DNA が含まれている可能性があるので、DNaseI 等の DNA 分解酵素処理することが好ましい。

取得された RNA 溶液は、これをフェノール／クロロホルム抽出やエタノール沈殿等の常法により精製したのち、逆転写反応に供することができる。逆転写反応は通常用いられる既知の方法を用いることができるが、cDNA の生成効率等から AMV リバーストランスクリプターゼを用いるのが好ましい。また、RNA LA PCR Kit (AMV) ver. 1.1 (TAKARA 社製) 等の市販のキットを用いることもできる。

逆転写反応によって作製した cDNA は、それ自体翻訳効率を制御する活性を有するポリヌクレオチドを含むものであるが、これをクローン化したり増幅したりすることもできる。クローン化する場合、上記で作製された cDNA を適当なベクターに挿入してクローン化してもよいし、上記 (1) で候補ポリヌクレオチドを含む鋳型として作製する際に共通配列を付加しておいた場合、この共通配列をセンスプライマー、コーディングポリヌクレオチドの 5' 端のヌクレオチド配列に相補的な配列をアンチセンスプライマーとして用いた PCR によって増幅した後に、適当なベクターに挿入してクローン化することもできる。このようにしてクローン化されたポリヌクレオチドは、これを上記 (1) の候補ポリヌクレオチドとして同様に鋳型を作製し、該鋳型を用いたタンパク質合成を行うことによってその翻訳効率の制御活性を確認することができる。タンパク質合成量の定量方法としては、具体的には、例えば、アミノ酸のタンパク質への取りこみ測定や、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動による分離とクマシーブリリアントブルー (CBB) による染色、オートラジオグラフィ法 (Endo, Y. et al., J. Biotech., 25, 221-230(1992); Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 559-564(2000)) 等を用いることができる。本発明の鋳型にルシフェラーゼのような発光触媒タンパク質をコードするものを用いた場合には、該タンパク質が触媒する反応により生ずる発光の強度を測定する方法が好ましく用いられる。また、該 cDNA のヌクレオチド配列を通常用いられる方法により解析することにより、翻訳効率の制御活性を有す

るヌクレオチド配列を特定することができる。

(5) 翻訳効率を制御する活性が更に上昇したヌクレオチド配列の選抜及び該ヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの取得方法

上記(4)に記載の方法により得られた cDNA を上記(1)の候補ポリヌクレオチドとして同様に鋳型を作製し、上記(1)～(4)に記載の方法を繰り返すことにより、翻訳効率の制御活性が更に上昇したポリヌクレオチドを取得し、そのヌクレオチド配列を同定することができる。また、上記(4)で取得される cDNA にそれ自体既知の通常用いられる方法により変異を導入し、該変異体を用いて上記(1)～(4)に記載の方法を繰り返すことによっても、翻訳効率の制御活性が更に上昇したポリヌクレオチドを取得し、そのヌクレオチド配列を同定することができる。ヌクレオチド配列に変異を入れる方法として、具体的には、エラープローン PCR 法、あるいはポイントミュータジェネシス法等が挙げられる。

かくして得られる翻訳効率の制御活性を有するポリヌクレオチドのうち、翻訳増強活性を有するものとして、配列番号 11～135 に示す配列からなるもの等が挙げられる。これらのポリヌクレオチドは、人工的にランダム化されたヌクレオチド配列からなるものであり、天然に存在する既知のヌクレオチド配列を含むものではない。また、本発明のポリヌクレオチドは、3～200mer の長さの人工的なランダムヌクレオチド配列からなり、且つ翻訳効率の制御活性を有する限り、その選抜、及び取得方法は上記の方法に制限されるものではない。

(6) 翻訳増強活性を有するポリヌクレオチドを含む鋳型によるタンパク質合成  
本発明の翻訳増強活性を有するポリヌクレオチドは、これを、プロモーター配列と目的のポリペプチドをコードするコーディングポリヌクレオチドとの間に挟まれるように結合させて翻訳に適した鋳型を作製することができる (Sawasaki, T. et al., PNAS, 99 (23), 14652-7 (2002))。コーディングポリヌクレオチドは、上記ポリペプチドのコーディング領域だけでなく、その転写ターミネーション領域等を含む 3' 非翻訳領域を含むことが好ましい。3' 非翻訳領域としては、ス

トップコドンより下流の約0.1～3.0キロベース程度が好ましく用いられる。また、プロモーターとしては、その後転写に用いる RNA ポリメラーゼに特異的なものを用いることができる。具体的には、SP6 プロモーター、T7 プロモーター等が挙げられる。

プロモーター、及びコーディングポリヌクレオチドと本発明の翻訳増強活性を有するポリヌクレオチドの結合方法としては、上記（1）に記載の方法、あるいはオーバーラップ PCR 法等を用いることができる。かくして得られる鋳型は上記（2）に記載の方法と同様にしてタンパク質合成系に供され、目的のポリペプチドを合成することができる。かくして得られたポリペプチドは、それ自体既知の方法により確認することができる。具体的には、例えば、アミノ酸のタンパク質への取りこみ測定や、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分離とクマシーブリリアントブルー（CBB）による染色、オートラジオグラフィ法（Endo, Y. et al., J. Biotech., 25, 221-230(1992) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 559-564(2000)）等を用いることができる。

また、かくして得られる反応液は、目的タンパク質を高濃度に含有しているので、該反応液を、透析、イオン交換クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィ、ゲル濾過等のそれ自体既知の分離、精製法により、目的ポリペプチドを取得することができる。

#### （7）翻訳増強活性を有するポリヌクレオチドを含むベクター

本発明の翻訳増強活性を有するポリヌクレオチドは、これを、適当なベクターに挿入することによって、タンパク質合成のための鋳型を作製するベクターを作製することができる。用いられるベクターとしては、適当なクローニングベクターや、T7 プロモーター、あるいは SP6 プロモーターや、転写ターミネーション領域を含むタンパク質合成用ベクター等が挙げられる。

以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例により限定されるものではない。

### 実施例 1 翻訳増強活性を有するヌクレオチド配列の候補ポリヌクレオチド（ランダム配列）の塩基組成の検討

#### (1) 3種類の塩基組成の候補ポリヌクレオチド（ランダム配列）をもった mRNA の作製

ルシフェラーゼ遺伝子 DNA (pSP-luc+ : Promega 社製、カタログ番号 : E1781) が挿入されたプラスミドを鋳型として、22mer の B (A を除いた T、C、G)、V (T を除いた A、C、G)、または H (G を除いた A、T、C) の混合塩基組成のランダム領域と、その 3' 側にルシフェラーゼのコーディング領域の 5' 端の配列を有し、また混合塩基組成領域の 5' 側に 12ヌクレオチドからなる共通配列、更にその 5' 側に SP6 プロモーターが連結した配列からなるセンスプライマー（それぞれ配列番号 1、2、3）、及びルシフェラーゼ遺伝子 DNA のストップコドンから 1652 ベース 3' 下流の配列を含むアンチセンスプライマー（配列番号 4）を用いて PCR を行った。得られた約 3400 bp の DNA 断片をエタノール沈殿により精製し、これを鋳型として、SP6 RNA Polymerase (Promega 社製) を用いて転写を行い、得られた RNA をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿の後、Nick Column (Amersham Pharmacia Biotech 社製) によって精製した。これを翻訳鋳型として以下の実験に用いた。

#### (2) コムギ胚芽抽出物含有液の調製

北海道産チホクコムギ種子(未消毒)を1分間に100gの割合でミル(Fritsch 社製 : Rotor Speed Mill pulverisette 14 型)に添加し、回転数 8,000 rpm で種子を温和に粉砕した。篩いで発芽能を有する胚芽を含む画分(メッシュサイズ 0.7~1.00 mm)を回収した後、四塩化炭素とシクロヘキサンの混合液(容量比=四塩化炭素 : シクロヘキサン = 2.4 : 1)を用いた浮選によって、発芽能を有する胚芽を含む浮上画分を回収し、室温乾燥によって有機溶媒を除去した後、室温送風によって混在する種皮等の不純物を除去して粗胚芽画分を得た。こ

の粗胚芽画分から目視によってコムギ胚芽を判別し、タケ串を用いて選別した。

得られたコムギ胚芽画分を4℃の蒸留水に懸濁し、超音波洗浄機を用いて洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄した。次いで、ノニデット (Nonidet: ナカライ・テクトニクス社製) P40の0.5容量%溶液に懸濁し、超音波洗浄機を用いて洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄してコムギ胚芽を得た。

コムギ胚芽抽出物含有液の調製は常法 (Erickson, A. H. et al., (1996) Meth. In Enzymol., 96, 38-50) に準じた。以下の操作は4℃で行った。まず液体窒素で凍結したコムギ胚芽を乳鉢中で微粉碎した。得られた粉体1g当たり1mlのPattersonらの方法を一部改変した抽出溶媒 (それぞれ最終濃度として、80mM HEPES-KOH (pH 7.6)、200mM 酢酸カリウム、2mM 酢酸マグネシウム、4mM 塩化カルシウム、各0.6mM L型アミノ酸20種類、8mM ジチオスレオトール) を加えて、泡が発生しないように注意しながら攪拌した。30,000×g、15分間の遠心によって得られる上清を胚芽抽出液として回収し、予め溶液 (それぞれ最終濃度として40mM HEPES-KOH (pH 7.6)、100mM 酢酸カリウム、5mM 酢酸マグネシウム、各0.3mMのL型アミノ酸20種類、4mM ジチオスレオトール) で平衡化したセファデックスG-25カラム (Amersham Pharmacia Biotech社製) でゲル濾過を行った。このようにして得られたコムギ胚芽抽出物含有液の濃度は、260nmにおける光学密度 (O.D.) (A<sub>260</sub>) が170~250 (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>=1.5) になるように調製した。

(3) コムギ胚芽抽出液による無細胞タンパク質合成系 (バッチ法) によるタンパク質合成

上記(2)で調製されたコムギ胚芽抽出物含有液5.8μlを含む蛋白質合成用反応液 (それぞれ最終濃度で、29mM HEPES-KOH (pH 7.8)、95mM 酢酸カリウム、2.7mM 酢酸マグネシウム、0.4mM スペルミジン (ナカライ・テクトニクス社製)、各0.23mM L型アミノ酸20種類、2.9mM ジチオスレオトール、1.2mM ATP (和光純薬社製)、0.25mM GTP (和光純薬社製)、15mM クレア

チンリン酸 (和光純薬社製)、0.9 U/ $\mu$ l RNase inhibitor (TAKARA 社製)、50 ng/ $\mu$ l tRNA (Monier, R., et al.; Biochim. Biophys. Acta., 43, 1-(1960))、0.46  $\mu$ g/l クレアチンキナーゼ (Roche 社製)) 2.5  $\mu$ l を作製した。この反応液に上記 (1) で作製したランダム配列を含む mRNA を 2 あるいは 8  $\mu$ g 加え、26  $^{\circ}$ C で 4 時間インキュベートした。

反応開始直後、30 分後、1 時間後、2 時間後、4 時間後の反応液各 5  $\mu$ l をろ紙にスポットし、固体支持法により、液体シンチレーションカウンター (LS6000IC: ベックマンコールター社製) を用いて  $^{14}$ C-leu の取り込みを測定した。この結果を図 1 に示す。それぞれの mRNA を用いた鑄型活性を比較すると、中でも G を除いた H 塩基組成領域をもった mRNA が高い鑄型活性を示した。このことから、以下の実験では、候補ポリヌクレオチド (ランダム配列) として H 塩基組成のものをを用いた。

## 実施例 2 翻訳増強活性を有するヌクレオチド配列の選抜

### (1) 候補ポリヌクレオチド (ランダム配列) を含む RNA の作製

ルシフェラーゼ遺伝子 DNA (pSP-luc+: Promega 社製、カタログ番号: E1781) が挿入されたプラスミドを鑄型として、H 塩基組成のランダムイズ部位 57 nts と、その 3' 側にコザック配列を付与するための A、更にその 3' 側にルシフェラーゼのコーディング領域の 5' 端ヌクレオチド配列を有し、またランダムイズ部位の 5' 側に共通配列 12 nts、更にその 5' 側に SP6 プロモーターが連結した配列からなるセンスプライマー (配列番号 5)、またはランダムイズ部位 22 nts と、その 3' 側にルシフェラーゼのコーディング領域の 5' 端ヌクレオチド配列を有し、またランダムイズ部位の 5' 側に共通配列 12 nts、更にその 5' 側に SP6 プロモーターが連結した配列からなるセンスプライマー (配列番号 3) と、ルシフェラーゼ遺伝子 DNA のストップコドンから 1652 ベース 3' 下流の配列を含むアンチセンスプライマー (配列番号 4) とを用いて PCR を行った。得られ

た約 3400 bp の DNA 断片をエタノール沈殿により精製し、これを鋳型として、SP6 RNA Polymerase (Promega 社製) を用いて転写を行い、得られた RNA をフェノール/クロロフォルム抽出、エタノール沈殿の後、Nick Column (Amersham Pharmacia Biotech 社製) によって精製した。これを翻訳鋳型として以下の実験に用いた。

## (2) コムギ胚芽抽出液による無細胞タンパク質合成系 (バッチ法) によるタンパク質合成

実施例 1 (2) で調製されたコムギ胚芽抽出物含有液 5.8  $\mu$ l を含む蛋白質合成用反応液 (それぞれ最終濃度で、29 mM HEPES-KOH (pH 7.8)、95 mM 酢酸カリウム、2.7 mM 酢酸マグネシウム、0.4 mM スペルミジン (ナカライ・テクトニクス社製)、各 0.23 mM L 型アミノ酸 20 種類、2.9 mM ジチオスレオトール、1.2 mM ATP (和光純薬社製)、0.25 mM GTP (和光純薬社製)、15 mM クレアチンリン酸 (和光純薬社製)、0.9 U/ $\mu$ l RNase inhibitor (TAKARA 社製)、50 ng/ $\mu$ l tRNA (Monier, R., et al., Biochim. Biophys. Acta., 43, 1-(1960))、0.46  $\mu$ g/l クレアチンキナーゼ (Roche 社製)) 2.5  $\mu$ l を作製した。この反応液に上記 (1) で作製したランダム配列を含む mRNA を 8  $\mu$ g 加え、26°C で 30 分間インキュベートした。30 分後、シクロヘキシミド (和光純薬社製) を最終濃度で 1.5  $\mu$ M になるように加え、タンパク質合成を中止した。

## (3) ショ糖密度勾配の作成

10% ショ糖溶液 (最終濃度で、25 mM Tris-HCl (pH 7.6)、50 mM 塩化カリウム、5 mM 塩化マグネシウム、10% ショ糖 (ナカライ・テクトニクス社製)、0.75  $\mu$ M シクロヘキシミド (和光純薬社製)、60% ショ糖溶液 (最終濃度で、25 mM Tris-HCl (pH 7.6)、50 mM 塩化カリウム、5 mM 塩化マグネシウム、60% ショ糖 (ナカライ・テクトニクス社製)、0.75  $\mu$ M シクロヘキシミド (和光純薬社製)) を、60% ショ糖溶液を下層に、10% ショ糖溶液を上層にして各 2.5 mL ずつ遠心管に入れた。その後、グラジエーター (東和科学社製:

BIOCOMP-GRADIENT MASTER) を用いて下記の設定で密度勾配を作った。(1回目、SPEED: 25 RPM、ANGLE: 55 deg.、TIME: 1min: 50 sec.、2回目、SPEED: 25 RPM、ANGLE: 83.5 deg.、TIME: 1min: 25 sec.) 作製した密度勾配溶液は4℃で3時間静置した。

(4) ショ糖密度勾配遠心分離法によるポリリボソーム画分の分離と RNA の抽出  
上記(2)のタンパク質合成中止後の反応液に希釈溶液(最終濃度で、25 mM Tris-HCl (pH 7.6)、50 mM 塩化カリウム、5 mM 塩化マグネシウム(ナカライ・テクトニクス社製) 75  $\mu$ l を加え、これを上記(3)で作製したショ糖密度勾配溶液に載せ、40,000 rpm、4℃で1時間遠心(HITACHI 社製: 遠心機 CP 65  $\beta$ 、ローターP55ST2)した。その後100~120  $\mu$ l ずつ画分を取り、各画分の260 nm における光学密度(O.D.)を計測した。この結果を図2に示す。タンパク質合成が円滑に進んでいると考えられる、ポリリボソームが見られる13~23画分(ショ糖濃度32.5~45%)を、AGPC 法(Chomczynski, P., et al., Anal. Biochem., 162, 156-159(1987))を用いて RNA 抽出した。この抽出液全量に対し DNase I (TAKARA 社製) 25U を加え、37℃で15分間インキュベートして残存 DNA を分解し、その後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。

#### (5) cDNA の作成と増幅

RNA LA PCR Kit (AMV) ver1.1 (TAKARA 社製) を用いて逆転写反応液(それぞれ最終濃度で、5 mM 塩化マグネシウム、1 $\times$ RNA PCR buffer、1 mM dNTP mixture、1.0  $\mu$ M アンチセンスプライマー(配列番号4)、1U/ $\mu$ l RNase Inhibitor、0.25 U/ $\mu$ l Reverse Transcriptase)を作製し、鋳型として上記(4)の RNA 抽出液全量を加えて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。この cDNA を増幅するため逆転写産物1  $\mu$ l を鋳型として、共通配列とその5'側に SP6 プロモーターの3'端配列を有するオリゴヌクレオチドをセンスプライマー(配列番号6)、ルシフェラーゼ遺伝子 DNA のスタートコドンのAから約60ベース下流の配列を含



むオリゴヌクレオチドをアンチセンスプライマー（配列番号 7）として用いて PCR を行い、約 150 bp の DNA 断片を得た。これに ExonucleaseI（USB 社製）を 5 U 加え 37℃で 30 分間インキュベート後、80℃で 30 分インキュベートを行い ExonucleaseI を失活させた。その後全量を GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit（アマシャムファルマシアバイオテック社製）を用いてアガロースゲルから回収した。

#### （6）次サイクルに用いる翻訳鋳型 mRNA の作製

ルシフェラーゼ遺伝子 DNA が挿入されたプラスミドを鋳型として、ルシフェラーゼ遺伝子 DNA のスタートコドンの A から約 60 ベース下流の配列を含む配列番号 7 に記載のアンチセンスプライマーと相補的な配列を有するセンスプライマー（配列番号 8）、及び配列番号 4 に示した配列より更に 2 ベース 3' 下流の配列を含むアンチセンスプライマー（配列番号 9）を用いた PCR を行い、ルシフェラーゼ遺伝子 DNA を部分的に含む約 3200 bp の DNA 断片を得た。この PCR 産物 1  $\mu$ l と上記（5）で回収した約 150 bp の DNA 断片の 50 分の 1 量の両 DNA 断片を鋳型にセンスプライマー（配列番号 10）、及びアンチセンスプライマー（配列番号 4）を用いて再度 PCR を行い約 3400 bp の DNA 断片を得た。この 4 分の 3 量を鋳型に SP6 RNA Polymerase（Promega 社製）を用いて転写を行い、得られた RNA をフェノール／クロロフォルム抽出、エタノール沈殿の後、Nick Column（Amersham Pharmacia Biotech 社製）によって精製した。これを翻訳鋳型として実施例 2（2）～（6）を 1 サイクルとし、2 巡目以降、（2）～（6）を繰り返した。

### 実施例 3 コムギ胚芽無細胞蛋白質合成系（バッチ法）における実施例 2 において得られた各サイクル後の mRNA の鋳型活性の検討

#### （1）コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系（バッチ法）によるタンパク質合成

実施例 1（2）で調製したコムギ胚芽抽出物含有液 5.8  $\mu$ l を含む蛋白質合成用反応液（それぞれ最終濃度で、29 mM HEPES-KOH（pH 7.8）、95 mM 酢酸

カリウム、2.7 mM 酢酸マグネシウム、0.4 mM スペルミジン (ナカライ・テクトニクス社製)、各 0.23 mM L 型アミノ酸 20 種類、2.9 mM ジチオスレオトル、1.2 mM ATP (和光純薬社製)、0.25 mM GTP (和光純薬社製)、15 mM クレアチンリン酸 (和光純薬社製)、0.9 U/ $\mu$ l RNase inhibitor (TAKARA 社製)、50 ng/ $\mu$ l tRNA (Moniter, R., et al., Biochim. Biophys. Acta., 43, 1-(1960))、0.46  $\mu$ g/l クレアチンキナーゼ (Roche 社製)、2 nCi/ $\mu$ l  $^{14}$ C-Leu (モラベック社製)) 25  $\mu$ l を作製した。この反応液に翻訳鋳型 mRNA を 2 あるいは 8  $\mu$ g 加え、26°C で 4 時間インキュベートした。

翻訳鋳型となる mRNA は、上記実施例 2 (6) で作成された DNA 断片を鋳型として、SP6 RNA polymerase (Promega 社製) を用いて転写を行い、得られた RNA をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿の後、Nick Column (Amersham Pharmacia Biotech 社製) により精製して用いた。また、コントロールの翻訳効率増強配列としてタバコモザイクウイルス (TMV) のオメガ ( $\Omega$ ) 配列を 5' 非翻訳領域に含み、3' 非翻訳領域がそれぞれ 0 nts、約 1600 nts の 2 種類の DNA 断片も同様に転写、精製し、コントロールとして用いた。

反応開始直後、30 分後、1 時間後、2 時間後、4 時間後の反応液各 5  $\mu$ l をろ紙にスポットし、固体支持法により、液体シンチレーションカウンター (LS6000IC: ベックマンコールター社製) を用いて  $^{14}$ C-leu の取り込みを測定した。この結果を図 3 に示す。ランダム部位が 22 nts の mRNA を用いた時は 4 サイクル後 (図 3 A)、57 nts の時は 3 サイクル後 (図 3 B) に、それぞれ  $\Omega$  配列を導入した mRNA と同等の鋳型活性を示した。

#### 実施例 4 コムギ胚芽無細胞蛋白質合成系 (バッチ法および透析法) における新規配列の効果の検討

##### (1) TA クローニング及びシーケンス

実施例 3 をもとに、実施例 2 (6) で得られたランダム部位が 22 nts の mRNA

を用いた時は4サイクル後、57ntsの時は3サイクル後のDNA断片を、pGEM-T Easy Kit (プロメガ社製) を用いて、反応液 (それぞれ最終濃度で、1×Rapid Ligation Buffer、5ng/μl pGEM-T Easy Vector) に加えて、14℃で4時間インキュベートして、DNA断片をpGEM-T Easy Vectorに組み込んだ。その後、全量を用いて大腸菌JM109 (TAKARA社製) にトランスフォーメーションを行い、形成されたコロニーからプラスミド抽出し、該プラスミド中の挿入配列についてシーケンスを行った。その結果、57ntランダムサイズでは27種類 (配列番号11～37)、22ntランダムサイズでは96種類 (配列番号40～135) の新規の配列を確認した。また、57ntランダムサイズで2サイクル後のDNA断片を同様にクローン化し、そのうちの一部について挿入配列のシーケンスを行った結果、配列番号38および39に示される新規配列を確認した。

## (2) 新規配列を含むDNA断片の作成

ルシフェラーゼ遺伝子DNA (pSP-luc+: プロメガ社製、カタログ番号: E1781) が挿入されたプラスミドを鋳型として、(1) で得られたヌクレオチド配列 (それぞれランダム部位が57ntsの場合はNo. 57-6: 配列番号11、No. 57-40: 配列番号15、No. 57-91: 配列番号20、ランダム部位が22ntsの場合は、No. 22-2: 配列番号41、No. 22-5: 配列番号44、No. 22-10: 配列番号49、No. 22-12: 配列番号51、No. 22-18: 配列番号57、No. 22-23: 配列番号62) とその5'側に共通配列と、その3'側にルシフェラーゼのスタートコドンを含む配列 (No. 57-6, No. 57-40, No. 57-91の場合は更にスタートコドンの5'側にコザックのA) とが連結されるようにデザインしたセンスプライマー (No. 57-6: 配列番号136、No. 57-40: 配列番号137、No. 57-91: 配列番号138、No. 22-2: 配列番号139、No. 22-5: 配列番号140、No. 22-10: 配列番号141、No. 22-12: 配列番号142、No. 22-18: 配列番号143、No. 22-23: 配列番号144) と、3'非翻訳領域が約1600ntsになるような配列番号4に記載したアンチセンスプライマーとを用いた

PCR を行った。得られた約 3 4 0 0 bp (3' 非翻訳領域が約 1 6 0 0 nts) の DNA 断片 1  $\mu$ l を鋳型として、共通配列の 5' 側に SP6 プロモーター配列を連結した配列を有するセンスプライマー (配列番号 1 4 5) と配列番号 4 に記載したアンチセンスプライマーとを用いた PCR を行い、再度約 3 4 0 0 bp の DNA 断片を得た。これを転写鋳型として以下の実験に用いた。

(3) コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系 (バッチ法) によるタンパク質合成

実施例 1 (2) で調製したコムギ胚芽抽出物含有液 5. 8  $\mu$ l を含む蛋白質合成用反応液 (それぞれ最終濃度で、2 9 mM HEPES-KOH (pH 7. 8)、9 5 mM 酢酸カリウム、2. 7 mM 酢酸マグネシウム、0. 4 mM スペルミジン (ナカライ・テクトニクス社製)、各 0. 2 3 mM L 型アミノ酸 2 0 種類、2. 9 mM ジチオスレオール、1. 2 mM ATP (和光純薬社製)、0. 2 5 mM GTP (和光純薬社製)、1 5 mM クレアチンリン酸 (和光純薬社製)、0. 9 U/ $\mu$ l RNase inhibitor (TAKARA 社製)、5 0 ng/ $\mu$ l tRNA (Moniter, R., et al., Biochim. Biophys. Acta., 43, 1-(1960))、0. 4 6  $\mu$ g/l クレアチンキナーゼ (Roche 社製)、2 nCi/ $\mu$ l  $^{14}$ C-leu (モラベック社製)) 2 5  $\mu$ l を作製した。この反応液に翻訳鋳型 mRNA を 2 あるいは 8  $\mu$ g 加え、2 6  $^{\circ}$ C で 4 時間インキュベートした。

翻訳鋳型となる mRNA は、上記 (2) で合成した DNA を鋳型として、SP 6 RNA polymerase (Promega 社製) を用いて転写を行い、得られた RNA をフェノール/クロロフォルム抽出、エタノール沈殿の後、Nick Column (Amersham Pharmacia Biotech 社製) により精製して用いた。また、コントロールの翻訳効率増強配列としてタバコモザイクウイルス (TMV) のオメガ ( $\Omega$ ) 配列を 5' 非翻訳領域に含み、3' 非翻訳領域がそれぞれ 0 nts、約 1 6 0 0 nts の 2 種類の DNA 断片も同様に転写、精製し、コントロールとして用いた。

反応開始直後、3 0 分後、1 時間後、2 時間後、4 時間後の反応液各 5  $\mu$ l をろ紙にスポットし、固体支持法により、液体シンチレーションカウンター (LS6000IC: ベックマンコールター社製) を用いて  $^{14}$ C-leu の取り込みを測定し

た。この結果を図4に示す。3' 非翻訳領域を含む mRNA で No. 57-6 (図4 B)、No. 22-12 (図4 A) 配列を含む RNA を用いた合成系においては、Ω 配列を含む RNA の場合と同量の目的タンパク質を合成することができた。このことは、得られた他の配列においても、同等もしくはそれ以上の翻訳鑄型活性を示すものと考えられる。

#### (4) コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系 (透析法) によるタンパク質合成

実施例1 (2) で調製したコムギ胚芽抽出物含有液 11.6  $\mu$ l を含む蛋白質合成用反応液 (それぞれ最終濃度で、2.9 mM HEPES-KOH (pH 7.8)、9.5 mM 酢酸カリウム、2.7 mM 酢酸マグネシウム、0.4 mM スペルミジン (ナカライ・テクトニクス社製)、各 0.23 mM L 型アミノ酸 20 種類、2.9 mM ジチオスレオトール、1.2 mM ATP (和光純薬社製)、0.25 mM GTP (和光純薬社製)、15 mM クレアチンリン酸 (和光純薬社製)、0.9 U/ $\mu$ l RNase inhibitor (TAKARA 社製)、50 ng/ $\mu$ l tRNA (Moniter, R., et al., Biochim. Biophys. Acta., 43, 1-(1960)), 0.46  $\mu$ g/l クレアチンキナーゼ (Roche 社製)) 50  $\mu$ l を作製した。この反応液に翻訳鑄型 mRNA を 16  $\mu$ g/50  $\mu$ l 加え、26℃で48時間インキュベートした。

翻訳鑄型となる mRNA は、GFP 遺伝子 DNA (Chiu, W.-L., et al., Curr. Biol. 6, 325-330 (1996)) が挿入された pEU-GFP ベクター (Sawasaki, T. et al., PNAS, 99 (23), 14652-7 (2002)) を基に、Ω 配列部分を No. 57-6 配列に置き換えた環状プラスミド DNA を鑄型として、SP6 RNA polymerase (Promega 社製) を用いて転写を行い、得られた RNA をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿の後、Nick Column (Amersham Pharmacia Biotech 社製) により精製して用いた。また、コントロールの翻訳効率増強配列としてタバコモザイクウイルス (TMV) のオメガ (Ω) 配列を 5' 非翻訳領域に含み、3' 非翻訳領域が約 1600 nts の DNA 断片を転写、精製し、コントロールとして用いた。

上記各合成系の反応液から 24、48 時間ごとに 0.5  $\mu$ l を採取し、12.

5% SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し、クマシーブリリアントブルー (CBB) による染色により分析した。この結果を図5に示す。3' 非翻訳領域を含む mRNA で No. 57-6 配列を含む RNA を用いた透析系においても、バッチ法と同様に  $\Omega$  配列を含む RNA の場合と同等の翻訳鑄型活性を示した。このことは、得られた他の配列においても、同等もしくはそれ以上の翻訳鑄型活性を示すものと考えられる。

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、天然に存在しない人工配列であって、かつ翻訳効率を制御する活性を有するヌクレオチド配列、及び該ヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドが提供される。該ポリヌクレオチドを用いることによりタンパク質合成系において極めて高効率にタンパク質合成を行うことができる。

本出願は日本で出願された特願 2001-396941 を基礎としており、その内容は本明細書にすべて包含されるものである。

また、本明細書において引用された特許および特許出願を含む文献は、引用したことによってその内容のすべてが開示されたと同程度に本明細書中に組み込まれるものである。

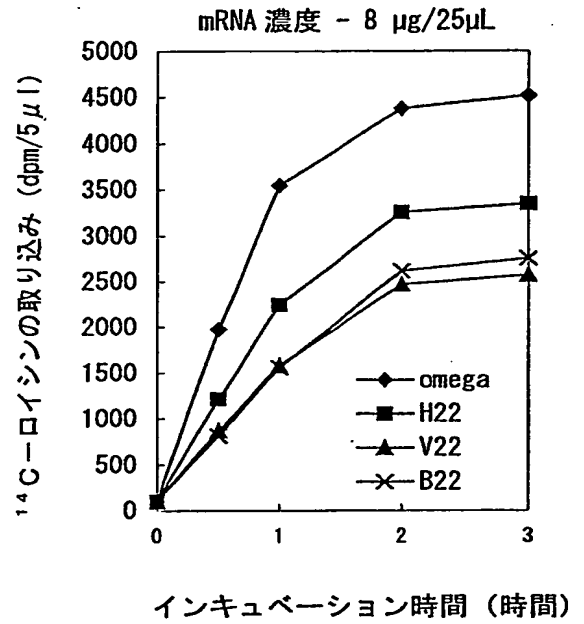
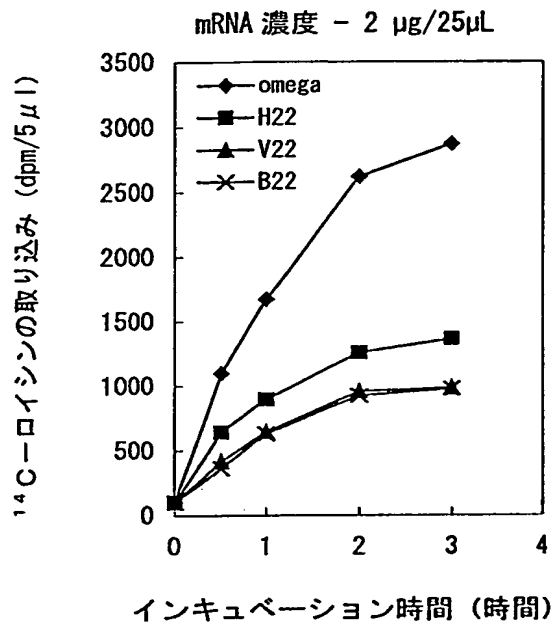
## 請 求 の 範 囲

1. タンパク質合成系において鑄型の翻訳効率を制御する活性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの調製方法であって、(a) 1種以上の任意のヌクレオチド配列を含む鑄型をタンパク質合成反応系に供し、(b) 反応後、該反応液中からポリリボソーム画分を回収し、(c) 該ポリリボソーム画分に含まれる鑄型中の該ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを採取することを特徴とする方法。
2. 工程(c)で得られたヌクレオチド配列を含む鑄型を用いて、前記(a)～(c)の工程を繰り返すことを特徴とする請求項1記載の方法。
3. 工程(c)で得られたヌクレオチド配列に変異を導入した配列を含む鑄型を用いて、前記(a)～(c)の工程を繰り返すことを特徴とする請求項1記載の方法。
4. ポリリボソーム画分の回収方法が、密度勾配遠心法を利用することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の方法。
5. タンパク質合成系が、コムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系である請求項1～4のいずれかに記載の方法。
6. 1種以上の任意のヌクレオチド配列が、スタートコドンをも有さないランダム配列であることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の方法。
7. ランダム配列の長さが、3～200merの範囲内であることを特徴とする請求項6記載の方法。
8. 翻訳増強活性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの調製方法であることを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載の方法。
9. 翻訳増強活性がRNAウィルスの5' - 非翻訳リーダー配列が有する活性と同等か、またはそれ以上であることを特徴とする請求項8記載の方法。
10. 請求項1～9のいずれかに記載の方法により得られる翻訳効率を制御する活性を有するポリヌクレオチド。

- 1 1. 配列番号 1 1 ~ 1 3 5 のいずれかで表されるヌクレオチド配列を含む翻訳増強活性を有するポリヌクレオチド。
- 1 2. 3 ~ 2 0 0 m e r の長さの人工的なランダムヌクレオチド配列からなる翻訳効率を制御する活性を有するポリヌクレオチド。
- 1 3. 翻訳効率を制御する活性が、RNA ウィルスの 5' - 非翻訳リーダー配列が有する活性と同等か、またはそれ以上であることを特徴とする請求項 1 2 記載のポリヌクレオチド。
- 1 4. 請求項 9 ~ 1 3 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む鋳型。
- 1 5. 請求項 1 4 記載の鋳型を用いることを特徴とするタンパク質合成方法。
- 1 6. 請求項 9 ~ 1 3 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
- 1 7. タンパク質合成系において鋳型の翻訳効率を制御する活性を有するヌクレオチド配列の選抜方法であって、(a) 1 種以上の任意のヌクレオチド配列を含む鋳型をタンパク質合成反応系に供し、(b) 反応後、該反応液中からポリリボソーム画分を回収し、(c) 該ポリリボソーム画分に含まれる鋳型中の該ヌクレオチド配列を解析することを特徴とする方法。
- 1 8. 工程(c)で得られたヌクレオチド配列を含む鋳型を用いて、前記 (a) ~ (c) の工程を繰り返すことを特徴とする請求項 1 7 記載の方法。

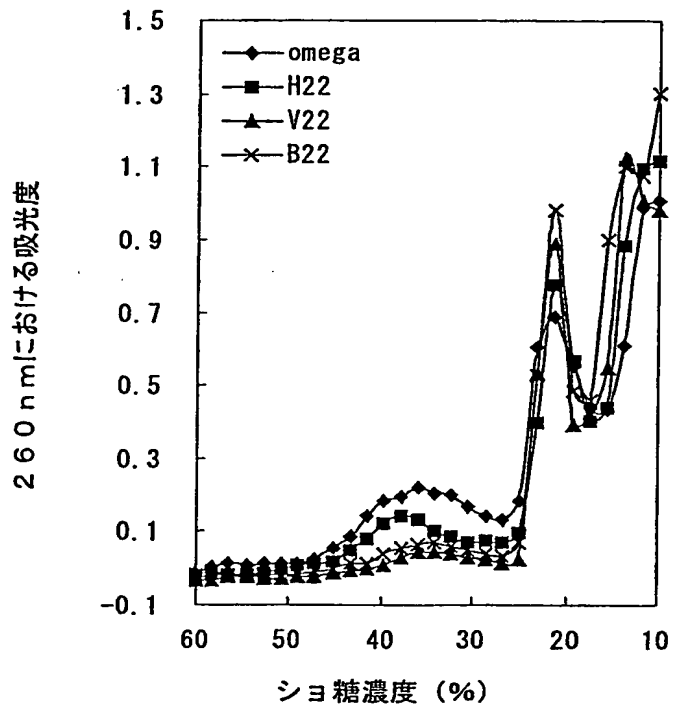


図 1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

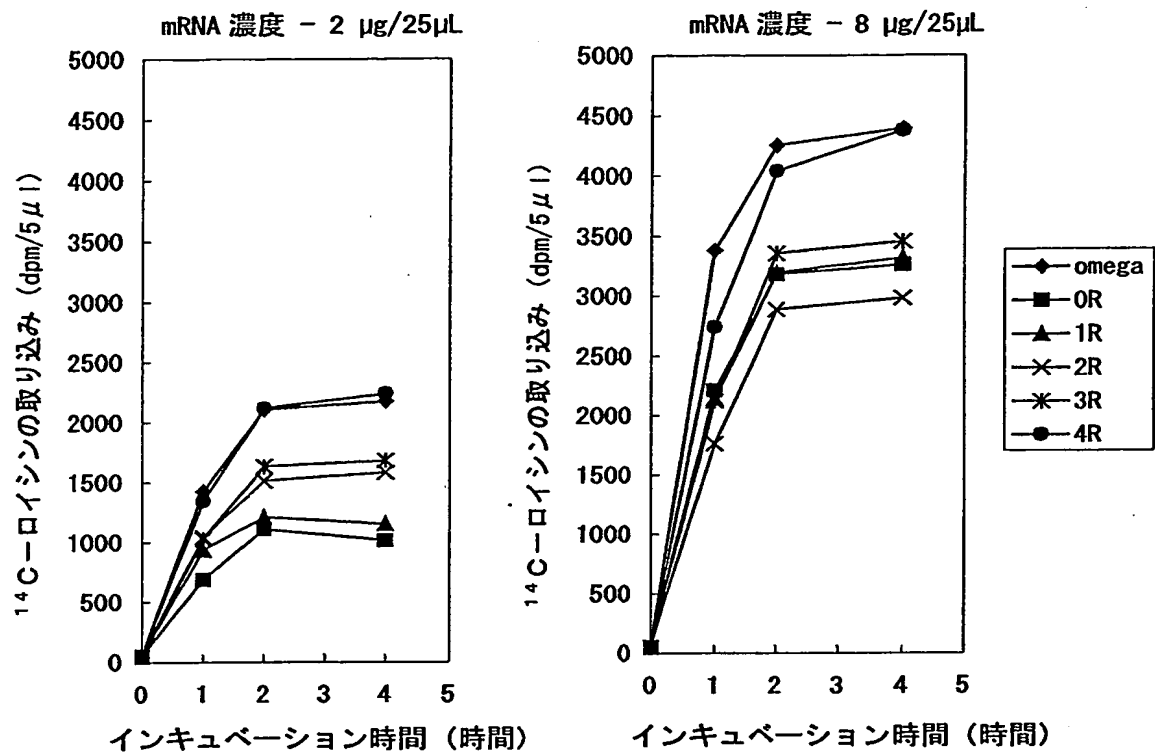
図 2



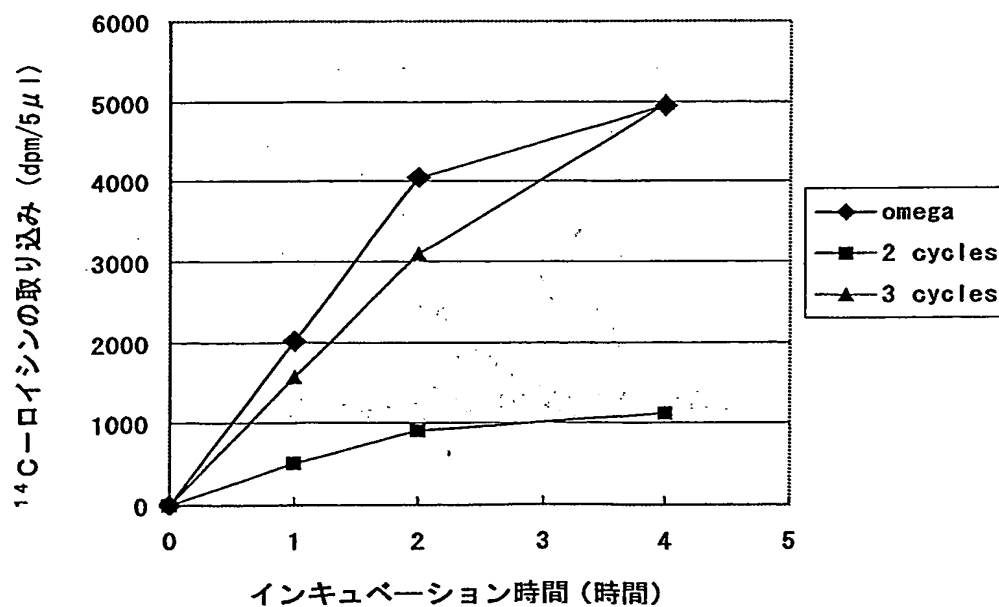
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 3

A.



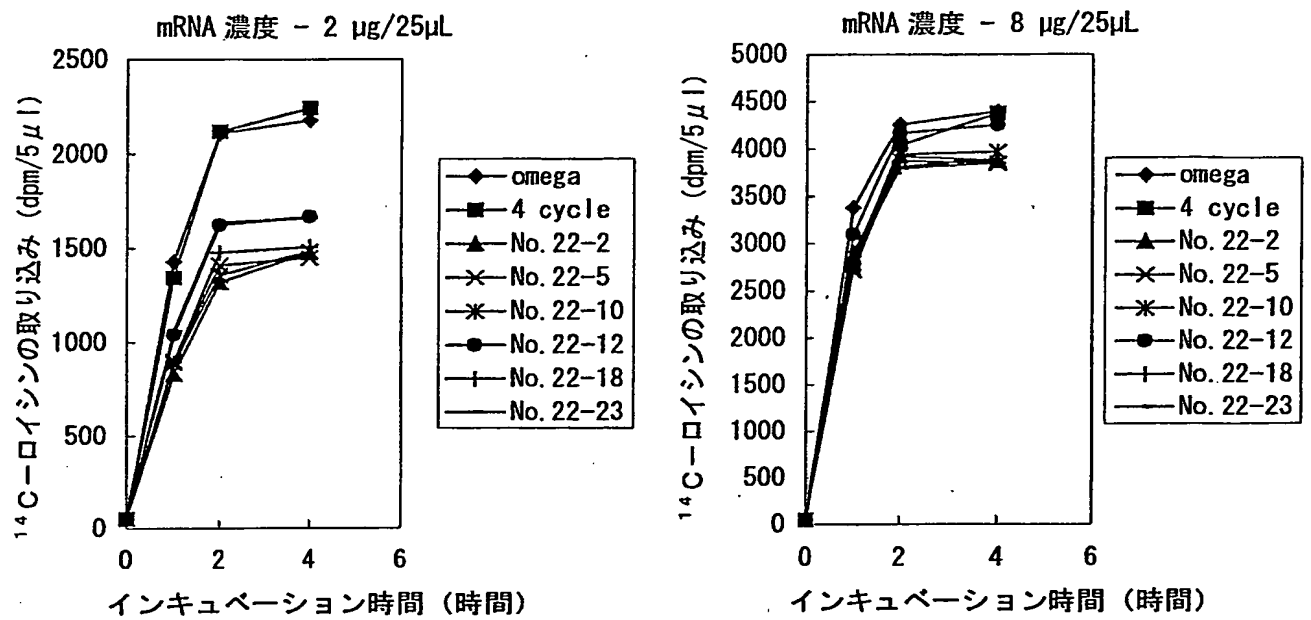
B.



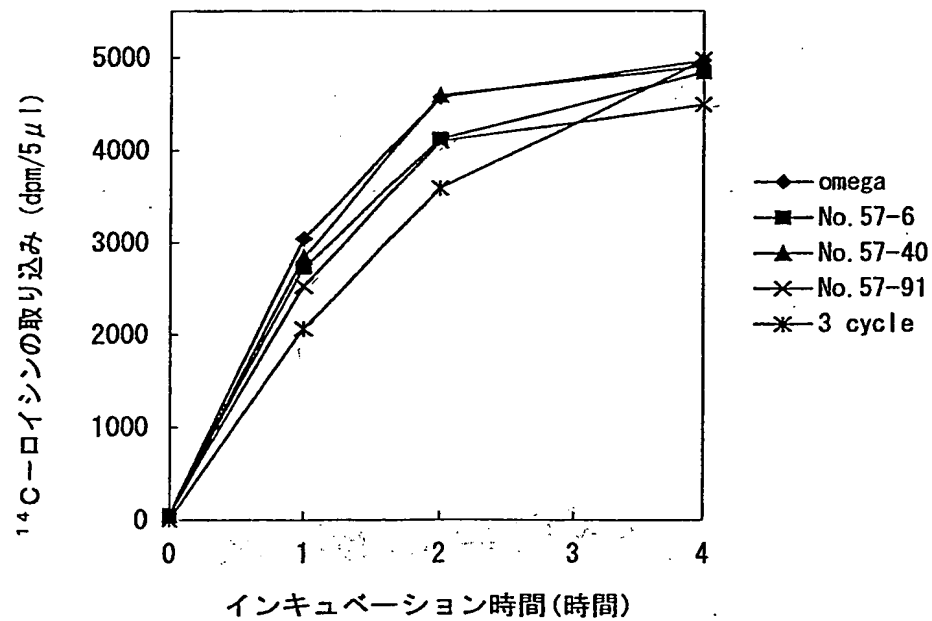
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 4

A.



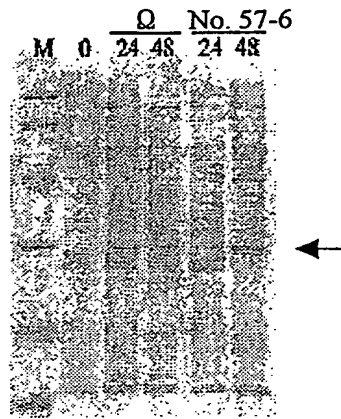
B.



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



図 5



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# SEQUENCE LISTING

<110> ENDO, Yaeta

<120> Nucleotide Sequence Having Activity Regulating Translation Efficiency and Use Thereof

<130> 09522

<150> JP 2001-396941

<151> 2001-12-27

<160> 145

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 1

cgatttaggt gacactatag aactcaccta tctcbbbb bbbbbbbbbb bbbbbbattgg  
aagacgcca aaaacat

60

76

<210> 2

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 2

cgatttaggt gacactatag aactcaccta tctcvvvvvv vvvvvvvvvv vvvvvvatgg  
aagacgcca aaaacat

60

76

<210> 3  
 <211> 76  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Synthetic DNA.  
  
 <400> 3  
 cgatttaggt gacactatag aactcaccta tctchhhhhh hhhhhhhhhh hhhhhhhatgg 60  
 aagacgccaa aaacat 76  
  
 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Synthetic DNA.  
  
 <400> 4  
 gtcagacccc gtagaaaaga 20  
  
 <210> 5  
 <211> 112  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Synthetic DNA.  
  
 <400> 5  
 cgatttaggt gacactatag aactcaccta tctchhhhhh hhhhhhhhhh hhhhhhhhhh 60  
 hhhhhhhhhh hhhhhhhhhh hhhhhhhhhh haatggaaga cgccaaaaac at 112  
  
 <210> 6  
 <211> 27

<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 6  
ggtgacacta tagaactcac ctatctc

27

<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA

<400> 7  
tatgcagttg ctctccagcg

20

<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 8  
ggagagcaac tgcataaggc

20

<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.  
 <400> 9  
 agcgtcagac cccgtagaaa 20  
 <210> 10  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Synthetic DNA.  
 <400> 10  
 gcgtagcatt taggtgacac t 21  
 <210> 11  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Synthetic DNA.  
 <400> 11  
 cccaacacct aataacattc aatcactctt tccactaacc acctatctac atcacca 57  
 <210> 12  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Synthetic DNA.  
 <400> 12  
 ataccactca atcccacact cacaccatcc cacacatccc ccacccatt ttctcca 57

<210> 13  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 13  
ccaccacatt catccatcct ctactcacta tatcaacccc tccacttacc tctccac 57

<210> 14  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 14  
cctaacacta cacaaccta tcaattcata ttttctaccc tcaactcactc actccca 57

<210> 15  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 15  
ctataaaccc accttaccaa tctccacatt caatatctct ccccttacc tcatcac 57

<210> 16  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 16

atctcaatac tacatctaac accaaacatc ctcccatcca ccataaacac tccacct

57

<210> 17

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 17

taccacatt caccactctc actaatatat taaccaatcc tattaaaaca acccacc

57

<210> 18

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 18

ctctactcac catttacctc caactcttcc ctacaatcta cccatcccct tcattat

57

<210> 19

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.



<400> 19  
cccccccct tacaattcca caaacacttt ctctttctat ctacctaaa ataacttc 57

<210> 20  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 20  
ccaacaccaa taccaactcc actcacctat ctccacctca cacacacttt tccatcc 57

<210> 21  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 21  
tcttccacct tatcccaccc acatccaatg cacataaaca ttcttcccat tttttct 57

<210> 22  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 22  
cccagtccea aaccacttca atttccttcc caccatccta accaattacc attaccc 57

<210> 23  
<211> 57

<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 23  
aactcaccat caaccaccct tcaacacccc atcttccctt accactactc taccaca

57

<210> 24  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 24  
tccacaacaa caccctcaca ccccatcata atctaatacta catttccata tttcaca

57

<210> 25  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 25  
aaccacccat ttatcccaac cttccccacc acacatatca tatctacatc taccctc

57

<210> 26  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 26

cccacaacaa caccctcaca ccccatcata atctaatacta catttccata tttcaca

57

<210> 27

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 27

ccccacataa tctacaaccc ccctcacacc atcaaacactc aatcaataac ccaacat

57

<210> 28

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 28

ccatcaccat ccacttaact tatccaacca taccaccccc cctatcctac cactccc

57

<210> 29

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 29

cccacaacaa caccctcaca ccccgtcata atctaatacta catttccata tttcaca

57

<210> 30  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 30  
ccactaccac ttaatctaaa actcacctaa tcaaaatcct catacctttc ccacttc

57

<210> 31  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 31  
aaccacccat ttatcccaac cttccccacc acacatatca tatctacatc tactctc

57

<210> 32  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(3)

<223> "n" stands for a, g, c or t.

<400> 32  
ccntcaccat ccacttaact tatccaacca taccaccccc cctatcctac cactccc

57

<210> 33  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 33  
cacccacta tcctaatac cctctaacta cataccacta cctatttata catacac 57

<210> 34  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 34  
cccacaacaa caccctcaca ccccatcata atctaatacta catttccata tttcaca 57

<210> 35  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 35  
cccacaacaa caccctcaca ccccatcata atctaatacta catttccata tttcaca 57

<210> 36  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 36

acaccactac cacaccccc cttaatttac aactcacctc ctactccac aaccaac

57

<210> 37

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 37

cacatcctaa ttcttacata acccacatta cctacatct taatcccaca ttctcac

57

<210> 38

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 38

tcatacctcaa cccacctcct atatatccca attttctcaa tcctccccct ttaata

57

<210> 39

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 39

tcacctcccc actccccaac ccaataacat aaacccccaa ccataaaaac tccactt

57

<210> 40

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 40

tccctactac cccttaactc tc

22

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 41

cttatacctat tttcctctta ca

22

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 42

cttttctttc attccttaac tt

22

<210> 43

<211> 22

<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 43  
cctttcaaaa ctcattaatt tc

22

<210> 44  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 44  
tcctatccaa ccatacatcc tt

22

<210> 45  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 45  
tcaattttcc accacactac tc

22

<210> 46  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature



<223> Synthetic DNA.

<400> 46

ttaatatgcc tcacattctc ta

22

<210> 47

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 47

tctcacaata tttataacaa tt

22

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 48

ttttcatcaa cactaactat cc

22

<210> 49

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 49

tcccacattc cccctatct ct

22

<210> 50  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 50  
cttttttttac tcctccaccc ct

22

<210> 51  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 51  
atTTTTtctt aattccctca tt

22

<210> 52  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 52  
tcacatctat taatctattc ac

22

<210> 53  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 53  
atttttccat ataaccttct ct

22

<210> 54  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 54  
ctttcattac cataaaatcc tt

22

<210> 55  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 55  
ctcatttcaa attttcttac ca

22

<210> 56  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 56

attccattcc ctaattttca at

22

<210> 57

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 57

tctccacttt tcttttacac cc

22

<210> 58

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 58

caaattcttta attcttcct ac

22

<210> 59

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 59

atTTTTtctt aattttccat tc

22

<210> 60

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 60

aaccaataat ccatacctttt ta

22

<210> 61

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 61

cttttcacta ctttacttct tt

22

<210> 62

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 62

acactatcaa tacctactct tt

22

<210> 63

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 63

taacacttat tcaataattc aa .

22

<210> 64

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 64

acttattttt ccacacttac tt

22

---

<210> 65

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 65

tttactattc tttctattct tt

22

<210> 66

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 66

tcattttacc aatcatccct ta

22

<210> 67

<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 67  
tcttaaccaa ttccatacca cc

22

<210> 68  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 68  
tacacatata atcctaattcc ct

22

<210> 69  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 69  
acacatctat tatccctctt ct

22

<210> 70  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 70  
ctacctccat ttcaaccata tt

22

<210> 71  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 71  
tctctatatt ttcaataaca ac

22

<210> 72  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 72  
acattaacac ttttttttaa cc

22

<210> 73  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 73  
tcaatcccct ttcataccaa tt

22



<210> 74  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 74  
tactctttta actcctattc ta

22

<210> 75  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 75  
tcacattatc ttttctcttt tc

22

<210> 76  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 76  
ctaccttacc aattttttac cc

22

<210> 77  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 77

gccttaccce ctcaccccct ca

22

<210> 78

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 78

tattcacatc accccttaac tt

22

<210> 79

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 79

tctcaacaac atactttttt ta

22

<210> 80

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 80  
cctactactt tccaatcttt tc 22

<210> 81  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 81  
ttttatattc aacatactat tc 22

<210> 82  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 82  
tctttcactt aaactatcca tt 22

<210> 83  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 83  
caccacccac acacatacaa ca 22

<210> 84  
<211> 22

<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 84  
acattctcca tacctacatt tc

22

<210> 85  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 85  
ccctaactca atcatcatac at

22

<210> 86  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 86  
aatcccccttt tcacaaacct tt

22

<210> 87  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 87

aatcccccttt tcacaaacct tt

22

<210> 88

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 88

aaccttccttc taaatccatc at

22

<210> 89

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 89

tacattcaca ctttaatttat cc

22

<210> 90

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 90

tacttatttta accctattca cc

22

<210> 91  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 91  
tcatactacc aaaaacctat ca

22

<210> 92  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 92  
tcattatcac attacactta ct

22

<210> 93  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 93  
tcaatatattc cctctctaaa at

22

<210> 94  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 94  
ttctatcatt ttctacttat ta

22

<210> 95  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 95  
atattattaa cccttttcaa at

22

<210> 96  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 96  
ctaacttcta cacaacattt tc

22

<210> 97  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 97

tactatctac cctcacacca ct

22

<210> 98

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 98

accaaacc aa ttttaattttt tc

22

<210> 99

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 99

tatatattccc ataattacaa aa

22

<210> 100

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 100

aacatttttt catcttttca ta

22

<210> 101

<211> 22

<212> DNA



<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 101

actctcacct tcaaccccct tt

22

<210> 102

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 102

tctctcatcc cacctcaatt tt

22

<210> 103

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 103

attctcttat catacacaca cc

22

<210> 104

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 104

tcactttttc caccacaatc ac

22

<210> 105

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 105

tcttttaaaa ctttcctcaa tc

22

<210> 106

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 106

tatttttcaa ccctatatta ta

22

<210> 107

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 107

ctatccttta aactctaacc tc

22

<210> 108

<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 108  
taaacttttc cttccctcta ct

22

<210> 109  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 109  
tatttcctca atttatctct ct

22

<210> 110  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 110  
tcccattaac tttcccaaac ct

22

<210> 111  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 111  
tcattcttcac caacccctca tt

22

<210> 112  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 112  
tctacacaaa acatttcct ac

22

<210> 113  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 113  
catcttacat aatatcttct at

22

<210> 114  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 114  
atccatccca ttgactttc cc

22

<210> 115  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 115  
tacaacaatt ttctaaccat aa

22

<210> 116  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 116  
ccctcacact atcatacct ct

22

<210> 117  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 117  
tctcaattac tacatttcac ca

22

<210> 118  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 118

acttctttta cctctcttct tt

22

<210> 119

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 119

atttctttcc tttatcattt ta

22

<210> 120

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 120

aattactttt tcttttccat ta

22

<210> 121

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 121  
accttatttta cactaaacat tt

22

<210> 122  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 122  
atacaacttt caacttccta tt

22

<210> 123  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 123  
tctattctttt tcactccaat cc

22

<210> 124  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 124  
ttacaccttc actaaatcac ta

22

<210> 125  
<211> 22

<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 125  
tctatttttaa tctctaacct tt

22

<210> 126  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 126  
ttttccacac actcctttcc at

22

<210> 127  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 127  
ttatttttatt cttctaattcc tc

22

<210> 128  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature



<223> Synthetic DNA.

<400> 128

ttcttcaaac acacacatta tt

22

<210> 129

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 129

cctcttttatt aatatcttct ct

22

<210> 130

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 130

tactcattta tctccttttc ta

22

<210> 131

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 131

caccatcaat ccactatatt tc

22

<210> 132  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 132  
taattattct acttcaattt tt

22

<210> 133  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 133  
atcatctact cacaaccct ta

22

<210> 134  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 134  
tcttcttatt actatacttc ct

22

<210> 135  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 135  
atcacttaaa ccttctcact ta

22

<210> 136  
<211> 90  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 136  
ctcacctatc tccccaacac ctaataacat tcaatcactc ttccactaa ccacctatct  
acatcaccaa atggaagacg ccaaaaacat

60

90

<210> 137  
<211> 90  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 137  
ctcacctatc tctataaac ccaccttacc aatctccaca ttcaatatct ctccccttac  
cctcatcaca atggaagacg ccaaaaacat

60

90

<210> 138  
<211> 90  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 138

ctcacctatc tcccaacacc aataccaact ccactcacct atctccacct cacacacact  
tttccatcca atggaagacg ccaaaaacat

60  
90

<210> 139

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 139

ctcacctatc tccttatcct attttcctct tacaatggaa gacgccaaaa acat

54

<210> 140

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 140

ctcacctatc tctcctatcc aaccatacat ccttatggaa gacgccaaaa acat

54

<210> 141

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 141

ctcacctatc tctcccatc tccccctat ctctatggaa gacgccaaaa acat

54

<210> 142  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 142  
ctcacctatc tcattttttc ttaattccct cattatggaa gacgccaaaa acat

54

<210> 143  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 143  
ctcacctatc tctctccact tttcttttac acccatggaa gacgccaaaa acat

54

<210> 144  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Synthetic DNA.

<400> 144  
ctcacctatc tcacactatc aatacctact ctttatggaa gacgccaaaa acat

54

<210> 145  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> misc\_feature

<223> Synthetic DNA.

<400> 145

cgatttaggt gacactatag aactcaccat etc

33

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13756

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A X	WO 01/27260 A1 (WAKENYAKU CO., LTD.), 19 April, 2001 (19.04.01), & EP 1221481 A1	1-9, 17, 18 10, 12-16
A	WO 00/68412 A1 (WAKENYAKU CO., LTD.), 16 November, 2000 (16.11.00), & EP 1176210 A1 & JP 2000-33673 A	1-9, 17, 18
A	JP 7-203984 A (ENDO Yaeta), 08 August, 1995 (08.08.95), (Family: none)	1-9, 17, 18
A	MADIN K. et al., A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes, Proc.Natl.Acad.Sci.USA Jan. 2000, Vol.97, No.2, pages 559 to 564	1-9, 17, 18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 March, 2003 (20.03.03)

Date of mailing of the international search report

01 April, 2003 (01.04.03)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

International application No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13756

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Although the invention as set forth in claim 1 relates to a method of preparing a polynucleotide containing a nucleotide sequence having an activity of controlling the translation efficiency of a template, the nucleotides obtained by the preparation method according to claim 1 and having the activity of controlling the translation efficiency of a template involve some non-novel nucleotides. Accordingly, the invention relating to a polynucleotide containing a nucleotide sequence having an activity of controlling the translation efficiency of a template as set forth in claim 1, the polynucleotides having an activity of controlling the translation efficiency of a template as set forth in claims 10, 12 and 13 (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1 to 10 and 12 to 18.
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

and the polynucleotide having an activity of potentiating the translation as set forth in claim 11 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The matter common to the inventions as set forth in claims 10, 12 and 13 and the invention as set forth in claim 11 resides in a polynucleotide having an activity of controlling the translation efficiency of a template. However, there had been known various enhancer sequences as polynucleotides having such an activity. Thus, the polynucleotide having an activity of controlling the translation efficiency of a template cannot be considered as a technical feature making a contribution over prior art.

The polynucleotides having an activity of potentiating translation which are represented by SEQ ID NOS:11 to 135 as set forth in claim 11 cannot be regarded as having any common structure. Also, the activity of potentiating translation cannot be regarded as a common structure and polynucleotides having an activity of potentiating translation are not novel. Thus, the inventions as set forth in claim 11 are classified into 125 groups of inventions relating respectively to the polynucleotides having an activity of potentiating translation which are represented by SEQ ID NOS:11 to 135 and these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Such being the case, the inventions as set forth in claims 1 to 18 are classified into the following 127 groups of inventions and these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

- (1) The inventions as set forth in claims 1 to 9, 17 and 18.
- (2) The inventions as set forth in claims 10 and 12 to 16.
- (3) The inventions relating respectively to the polynucleotides represented by SEQ ID NOS:11 to 135 in the inventions as set forth in claims 11 and 14 to 16.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/09

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A X	WO 01/27260 A1 (WAKENYAKU CO., LTD.) 2001. 04. 19 & EP 1221481 A1	1-9, 17, 18 10, 12-16
A	WO 00/68412 A1 (WAKENYAKU CO., LTD.) 2000. 11. 16 & EP 1176210 A1 & JP 2000-333673 A	1-9, 17, 18
A	JP 7-203984 A (ENDO YAETA) 1995. 08. 08 (ファミリーなし)	1-9, 17, 18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 03. 03

国際調査報告の発送日

01.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり



4N

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



## 第II欄の続き

また、請求の範囲10、12、13に記載された発明と請求の範囲11に記載された発明の共通事項は、鋳型の翻訳効率を制御する活性を有するポリヌクレオチドであるが、このような活性を有するポリヌクレオチドとして様々なエンハンサー配列が公知であるから、鋳型の翻訳効率を制御する活性を有するポリヌクレオチドは、先行技術に対して貢献する技術的特徴と認めることができない。

また、請求の範囲11に記載された配列番号11～135の配列番号に示される翻訳増強活性を有するポリヌクレオチドは、共通な構造を有するとはいえず、また、翻訳増強活性を共通な構造を有するとはいえず、また、翻訳増強活性を有するポリヌクレオチドは新規であるとはいえないので、請求の範囲11に記載された発明は、配列番号11～135の配列番号のいずれかに示される翻訳増強活性を有するポリヌクレオチドの125の発明群に区分され、当該発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

したがって、請求の範囲1～18に記載された発明は、

- (1) 請求の範囲1～9、17、18に記載された発明、
  - (2) 請求の範囲10、12～16に記載された発明
  - (3) 請求の範囲11、14～16のうち、配列番号11～135の配列番号のそれぞれに示されるポリヌクレオチドに関連する発明、
- の127の発明群に区分され、当該発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1 に記載された発明は、鋳型の翻訳効率を制御する活性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの調製方法であるが、請求の範囲 1 に記載の調製方法により得られる鋳型の翻訳効率を制御する活性を有するヌクレオチドには、新規でないものも含まれるので、請求の範囲 1 に記載にされた鋳型の翻訳効率を制御する活性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの調製方法に係る発明と、請求の範囲 10、12、13 に記載された翻訳効率を制御する活性を有するポリヌクレオチド及び請求の範囲 11 に記載された翻訳増強活性を有するポリヌクレオチドは、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

(別紙に続く)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

請求の範囲 1-10、12-18

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

